

DISCRIMINACIÓN DE HECES DE PUMA (*Puma concolor*) Y JAGUAR (*Panthera onca*) POR IDENTIFICACIÓN DE SUS ÁCIDOS BILIARES: UNA TÉCNICA PARA EL MONITOREO DE CARNÍVOROS SILVESTRES

Ada V. Cazón¹, Victor D. Juarez¹, J. A. Monjeau² y M. Lilienfeld³

¹ Consejo de Investigación de la Universidad Nacional de Salta. Av. Bolivia 5150, 4400 Salta, Argentina. ² Instituto de Análisis de Recursos Naturales, Universidad Atlántida Argentina, Alvear 2369, 7600 Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina [Correspondencia <amonjeau@parkswatch.org>]. ³ Servicio Nacional de Áreas Protegidas, La Paz, Bolivia.

RESUMEN: Es frecuente el uso de las heces como fuente de información en los estudios de registro de fauna. Aquellas son de gran utilidad para los grandes carnívoros, ya que éstos son muy difíciles de ver. Sin embargo, la identificación específica no es siempre correcta, especialmente en especies simpátricas. Ese es el caso del puma y del jaguar en altitudes intermedias del Parque Nacional Amboró en Bolivia, nuestro caso de estudio. Para resolver este problema hemos utilizado una simple técnica de laboratorio, la cromatografía de capa fina (TLC por sus siglas en inglés). La TLC permite la identificación específica por determinación cromatográfica de ácidos biliares. La intensidad, el color y la presencia o ausencia de ácidos biliares en las heces varía entre especies. En este trabajo hemos comparado los patrones de ácidos biliares de muestras obtenidas en el parque nacional Amboró con muestras testigo obtenidas de zoológicos y estaciones faunísticas. El resultado muestra que el patrón de ácidos biliares del puma está compuesto por los ácidos litocólico, dehydrocólico, deoxicólico, quenodeoxicólico, cólico-glicocólico y cuatro ácidos no identificados. El patrón de ácidos biliares del jaguar está compuesto por los ácidos litocólico, dehydrocólico, deoxicólico, cólico, glicocólico y tres ácidos no identificados. Encontramos colesterol en todas las muestras. Se destaca la utilidad de esta técnica para monitoreos de fauna por ser barata y simple.

ABSTRACT: Identification of puma and jaguar feces through the analysis of fecal bile acids: a technique to monitoring wildlife carnivores. In faunal surveys, it is frequent to use feces as a source of information of many studies. This methodology is very useful for large carnivores that are difficult to see. However, the specific identification is not always correct, especially when two species have the same distribution. This is the case of puma and jaguar at intermediate altitudes in Amboró National Park in Bolivia, our case study. To solve this problem we used a simple laboratory technique, thin layer chromatography that allows the identification of species by chromatographic determination of intensity, colour and presence/absence pattern of fecal bile acids. We compared the bile acid pattern of samples collected in Amboró National Park with that one of known samples from zoos and fauna stations. The results show that the cougar bile acid pattern was: lithocholic, dehydrocholic, deoxycholic, quenodeoxycholic, cholic glycocholic and four non identified bile acids. The jaguar bile acid pattern was: lithocholic, dehydrocholic, deoxycholic, cholic, glycocholic

and three non identified bile acids. We found cholesterol in all samples. The use of this technique is very important because it is cheap and simple for fauna monitoring.

Palabras clave. Ácidos biliares. Cromatografía de capa fina. Fecas. Félinos,

Key words. Bile acids. Feces. Felids. Thin layer chromatography.

Estudiar grandes carnívoros es difícil: no se dejan ver, son escasos, sus huellas no siempre conducen a una identificación segura y es casi imposible distinguir inequívocamente las heces de especies simpátricas. Como huellas y heces son los indicadores de presencia más frecuentes, los trabajos que ayuden a refinar estas técnicas se constituyen en herramientas fundamentales para los estudios de registro de fauna.

Muchos investigadores han utilizado las heces colectadas a campo como fuente de información para realizar estudios de dieta, dinámica poblacional y de distribución (Johnson et al., 1981), usualmente identificadas por su color, olor, forma, tamaño; junto a huellas y pelos ingeridos. El diámetro de las heces y huellas son factores importantes en la determinación de heces de *Panthera*, *Civettictis* y *Atilax* (Ray y Sunquist, 2001). El problema es que el paso del tiempo modifica estas características impidiendo muchas veces una identificación positiva (Cazón y Sühling, 1999).

Existe una solución a estos problemas, ya que los ácidos biliares fecales siguen un patrón determinado para cada especie (Haslewood, 1967) y son muy estables. La estabilidad ha sido demostrada estudiando las pocas variaciones que existen entre los ácidos biliares fecales de heces del hombre actual y de 2000 años de antigüedad (Lin et al., 1978). El empleo de la cromatografía en capa fina (TLC) como técnica sensible, relativamente barata y no invasiva, permitió determinar el patrón de ácidos biliares fecales de especies muy difíciles de avistar como algunos félidos (Cazón y Sühling, 1999), ya que estas contienen baja concentración de ácidos biliares y de pigmentos vegetales que pudieran interferir en su detección (Roscoe y Fahrenbach, 1963; Major et al., 1980). Algunos autores han cues-

tionado la viabilidad del método, en especial para aquellas especies con dietas de alta concentración de fibras (Quinn y Jackman, 1994).

El patrón de ácidos biliares determinado con esta técnica resultó satisfactorio para distinguir *Felis onca* y *Puma concolor* (Fernández et al., 1997); *Linx rufus*, *Canis latrans*, *Procyon lotor* y *Vulpes vulpes* (Major et al., 1980); *Felis concolor* y *Lutra canadensis* (Johnson et al., 1982) y *Felis concolor* y *Felis rufus* (Johnson et al., 1984). Fernández et al. (1997), usando otros solventes y eluyentes pudieron encontrar el patrón de ácidos biliares de puma y jaguar donde destacan que la diferencia entre ellos es la presencia del ácido quenodeoxicólico en puma.

El objetivo del trabajo fue discriminar heces de puma (*Puma concolor*) y jaguar (*Panthera onca*) usando TLC, por identificación de sus ácidos biliares. Esta discriminación fue hecha a pedido de un equipo de relevamiento de fauna silvestre en el Parque Nacional Amboró, en Bolivia, donde era probable la presencia de ambas especies. Las muestras fueron colectadas a pocos metros de una vaca muerta y parcialmente comida por un depredador. Los guardaparques aseguraban que se trataba de heces de jaguar, basados en las características de las mordidas en la vaca muerta, "mordida más grande, más fuerte, el puma no puede hacer eso", una evidencia indirecta de identificación de heces. Este tipo de conocimiento empírico es típico de baqueanos y guardaparques, generalmente ciertos. El problema no es de ellos, que están seguros, sino de los científicos, que necesitan otro tipo de constatación. La metodología aquí presentada brinda la herramienta necesaria para la certeza.

Las heces objeto de este estudio fueron colectadas en la parte alta del Parque Nacio-

nal Amboró de Bolivia. El parque se encuentra entre las coordenadas 17° 43' y 17° 55' de latitud sur. La TLC de los extractos de estas heces se comparó con perfiles conocidos obtenidos a partir de heces de procedencia conocida. Se trabajó con cinco muestras diferentes de puma y de jaguar recolectadas de los Zoológicos de Mendoza, La Plata, Córdoba, La Paz (Bolivia) y de la Estación de Cría Vucetich de Jujuy (Argentina).

Las heces frescas fueron secadas a temperatura ambiente, molidas y guardadas en frascos, al abrigo de la luz. Un gramo de muestra molida se extrajo con 20 mL de 1:1 benceno:metanol (v/v), se agitó durante tres horas a temperatura ambiente conjuntamente con carbón activado y se filtró (Cazón y Sühling, 1999). Se usaron como ácidos biliares estándares: ácido glicocólico, ácido cólico, ácido deoxicólico, ácido dehidrocólico, ácido litocólico, ácido taurodeoxicólico, ácido taurocólico, ácido quenodeoxicólico y ácido cólico metil éster. Además se usó colesterol, todos estos estándares de la empresa SIGMA y fueron preparados al 1% en cloroformo. Los extractos de las heces y los ácidos biliares estándares fueron eluidos en capa fina (TLC) en placas de vidrio de 20x10 cm con silicagel G60 Merk (preparadas en laboratorio y activadas durante 1 h a 100 °C). La cantidad sembrada de cada muestra y cada estándar fue de 15 ml en cada placa, se realizaron cuarenta repeticiones para puma y treinta y ocho para jaguar. Las placas se desarrollaron en tolueno: ácido acético: agua (5:5:1,5) y se revelaron con anisaldehído: ácido acético glacial: ácido sulfúrico (0,5:50:1) en estufa a 150 °C durante 20 minutos (Cazón y Sühling, 1999).

Los patrones diferenciales de los ácidos biliares presentes en cada especie, se determinaron por comparación con los estándares a partir del intervalo de confianza ($M \pm EE \times t_{\alpha/2} \times \delta$) obtenido de los valores de sus R_f (relación entre la distancia recorrida por la banda y la distancia recorrida por el eluyente). La concentración relativa de los ácidos biliares presentes en las muestras en estudio fue determinada por comparación con la intensidad del color de las bandas de los estándares.

Tabla 1

Patrones de ácidos biliares de puma, jaguar y ácidos biliares estándares. R_f promedios ($\text{Media} \pm \text{EE}$), color de cada banda y concentración dada por intensidad del color. (*) Ácidos biliares no identificados en cada patrón.

Estándares	R_f Estándares (n=20)	Intervalo de confianza de estándares	R_f Puma (n=40)	Intensidad (puma)	R_f Jaguar (n=38)	Intensidad (jaguar)	R_f de muestras de campo (n= 38)	Color
*	-	-	0.57 \pm 0.05	XX	0.58 \pm 0.05	XX	0.59 \pm 0.05	Azul-Violáceo
*	-	-	-	-	0.56 \pm 0.04	X	0.56 \pm 0.02	Azul-Violáceo
Colesterol	0.60 \pm 0.05	[0.69; 0.51]	0.56 \pm 0.04	XXX	0.54 \pm 0.05	XXX	0.55 \pm 0.04	Violeta
Litocólico	0.51 \pm 0.03	[0.56; 0.46]	0.53 \pm 0.03	X	0.52 \pm 0.03	XX	0.52 \pm 0.03	Verde-Grisáceo
*	-	-	0.41 \pm 0.05	X	0.41 \pm 0.04	XX	0.42 \pm 0.03	Azul
Dehidrocólico	0.38 \pm 0.04	[0.45; 0.31]	0.40 \pm 0.03	XX	0.39 \pm 0.03	X	0.38 \pm 0.02	Anaranjado
Deoxicólico	0.33 \pm 0.04	[0.39; 0.26]	0.35 \pm 0.03	XXX	0.31 \pm 0.04	XXX	0.32 \pm 0.03	Marrón
Quenodeoxicólico	0.30 \pm 0.03	[0.35; 0.25]	0.33 \pm 0.02	XX	-	-	-	Azul-Violáceo
*	-	-	0.25 \pm 0.02	X	-	-	-	Azul-Violáceo
*	-	0.16 \pm 0.04	-	X	-	-	-	Azul-Violáceo
Cólico	0.13 \pm 0.03	[0.18; 0.08]	0.10 \pm 0.03	X	0.11 \pm 0.03	XX	0.11 \pm 0.04	Azul-Violáceo
Glicocólico	0.09 \pm 0.03	[0.14; 0.04]	0.05 \pm 0.03	X	0.05 \pm 0.03	X	0.07 \pm 0.04	Azul-Violáceo

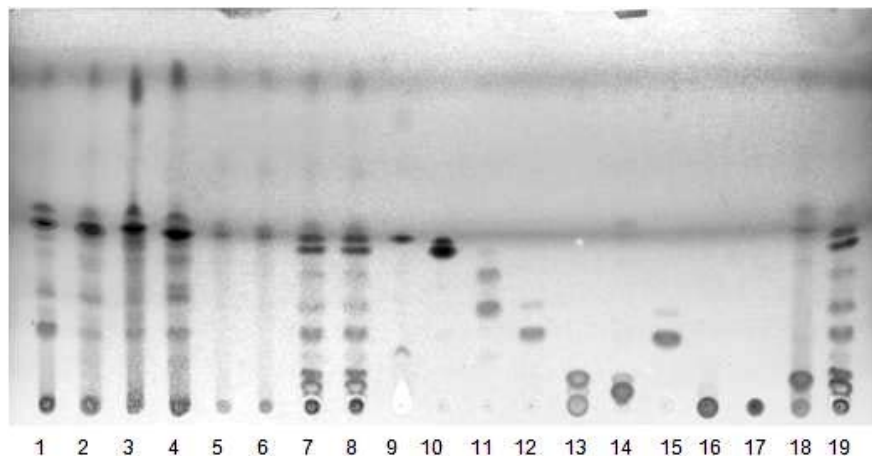


Fig. 1. Placa cromatográfica mostrando los patrones de ácidos biliares de puma, jaguar y ácidos biliares estándares. 1. Puma (Zoológico de Córdoba); 2. Puma (Estación Vucetich); 3. Jaguar (Zoológico de Córdoba); 4. Jaguar (Estación Vucetich); 5 y 6. Muestras de campo diluidas (Parque Amboró); 7 y 8. Muestras de campo enriquecidas con ácidos biliares estándares (Parque Amboró); 9. Colesterol; 10. Ácido litocólico; 11. Ácido dehidrocólico; 12. Ácido deoxicólico; 13. Ácido glicocólico; 14. Ácido cólico; 15. Ácido quenodeoxicólico; 16. Ácido taurocólico; 17. Ácido taurodeoxicólico; 18. Ácido cólico-metilester; 19. Punto mezcla de ácidos biliares.

Los extractos obtenidos de las heces de zoológicos y/o estaciones de cría usados como perfiles de comparación, resultaron marrón oscuro el de jaguar y pardo el de puma. La TLC realizada para los extractos de cada una de las especies (se analizaron cinco muestras de cada especie), no mostró variaciones en los patrones de ácidos biliares presentes entre individuos, tampoco en el color de las bandas, pero si en la intensidad del color de las mismas. Los patrones de ácidos biliares de puma y jaguar fueron fácilmente diferenciables. En puma se observó presencia de un ácido biliar no identificado con R_f mayor que colesterol, menor concentración de colesterol y de ácido litocólico, mayor concentración de ácido dehidrocólico, menor concentración de ácido cólico, presencia de ácido quenodeoxicólico (banda 15 de placa cromatográfica en **Fig. 1**) y tres esteroides no identificados con R_f menor que el colesterol. En jaguar se observó presencia de dos ácidos biliares no identificados con R_f mayor que colesterol, mayor concentración de colesterol y de ácido litocólico, menor concentración de ácido dehidrocólico,

mayor concentración de ácido cólico y un ácido biliar no identificado con R_f menor que el colesterol (presente en puma; **Tabla 1**). En ambas especies, las concentraciones de los ácidos deoxicólico y glicocólico fueron similares. No se detectó la presencia de ácido cólico metil éster en ninguna de las especies. Los ácidos taurodeoxicólico y taurocólico quedaron en la siembra, no se desplazaron con el sistema de solventes empleado (**Fig. 1**).

El análisis de las muestras provenientes del Parque Nacional Amboró en comparación con los patrones de ácidos biliares obtenidos para puma y jaguar, presentó el mismo patrón de ácidos biliares que jaguar (**Tabla 1**, **Fig. 1**), pero se observó menor concentración de los mismos (menor intensidad del color de las bandas).

La técnica empleada permitió extraer, visualizar y determinar los ácidos biliares de heces de puma y jaguar, por comparación con los patrones de ácidos biliares estándares. La TLC supone que los ácidos biliares fecales y sus concentraciones relativas siguen un patrón determinado para cada especie, que la dieta

no afecta la incidencia y relativa concentración de estos (Quinn y Jackman, 1994). En nuestro estudio encontramos que las muestras de campo comparativamente a las de zoológico y estaciones de cría presentaron menor concentración de los ácidos biliares, hecho que se atribuye a las condiciones climáticas a las que están expuestas las muestras (Khorozyan et al., 2007).

El espectro de colores obtenidos para los diferentes ácidos biliares por oxidación con anisaldehído, permitió identificarlos en las muestras, lo interesante es que se pudieron diferenciar aun teniendo R_f muy parecidos (ácidos quenodeoxicólico y deoxicólico) lo que se puede observar en el punto mezcla de los ácidos biliares (**Fig. 1**).

El intervalo de confianza de los diferentes ácidos biliares estándares, permitió obtener un rango para los R_f de los ácidos biliares de las muestras, lo que permitió su identificación por este valor y el color de la bandas.

Las características diferenciales entre puma y jaguar se deben a la presencia de una banda solapada al colesterol en forma de cúspide en jaguar, y en puma presencia del ácido quenodeoxicólico y dos ácidos biliares no identificados con R_f menor que este (**Fig. 1**). La comparación del patrón de los ácidos biliares encontrados en las muestras del Parque Nacional Amboró con lo anteriormente descrito permitió identificar las muestras objeto de estudio como jaguar.

Más allá del resultado puntual, el trabajo demuestra la utilidad de esta técnica para la identificación inequívoca de especies de mamíferos a partir de heces en relevamientos de campo. También demuestra que, admirablemente, los guardaparques, atando cabos entre una vaca muerta, el tipo de mordida y la presencia de heces cercanas, tenían razón en identificar las heces como de jaguar y no de puma, sirva este trabajo de homenaje a su sabiduría.

Agradecimientos. A S. Sührling por su asesoramiento estadístico, al Consejo de Investigación de la Universidad Nacional de Salta por el apoyo económico, al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por el salario de JAM, a los guardaparques del Parque Nacional Amboró por su apoyo en las tareas de campo.

LITERATURA CITADA

- CAZÓN AV y S SÜHRING. 1999. A technique for extraction and thin layer chromatography visualization of fecal acids applied to Neotropical felid cats. *Revista de Biología Tropical* 47:245-249.
- FERNÁNDEZ GJ, JC CORLEY y AF CAPURRO. 1997. Identification of cougar and jaguar feces through bile acid chromatography. *Journal Wildlife Management* 61:506-510.
- HASLEWOOD GAD. 1967. Bile salt evolution. *Journal of Lipid Research* 8:535-530.
- JOHNSON MK, DR ALDRED, EW CLINITE y MJ KUTILEK. 1981. Biochemical identification of bobcat scats. *In: Bobcat Research Conference Proceedings. National Wildlife Federation Scientific and Technical Series* 6:92-96.
- JOHNSON MK, DR ALDRED y TE MARTIN. 1982. Feces bile acids and furbearers. *The Worldwide Furbearer Conference Proceedings* 1143-1150.
- JOHNSON MK, RC BELDEN y DR ALDRED. 1984. Differentiating mountain lion and bobcat scats. *Journal Wildlife Management* 48:239-244.
- KHOROZYAN IG, AV CAZÓN, AG MALKHASYAN y AV ABRAMOS. 2007. Using thin-layer chromatography of fecal bile acids to study the leopard (*Panthera pardus ciscaucasica*) population. *Biology Bulletin* 34:361-366.
- LIN DS, WE CONNOR, LK NAPTON y RF HEIZER. 1978. The steroids of 2000-year-old human coprolites. *Journal of Lipid Research* 19:215-221.
- MAJOR M, MK JOHNSON, W SHAW DAVIS y TF KELLOGG. 1980. Identifying scats by recovery of bile acids. *Journal Wildlife Management* 44:290-293.
- QUINN T y WR JACKMAN. 1994. Influence of diet on detection of fecal bile acids by thin-layer chromatography. *Journal Wildlife Management* 58:295-299.
- RAY JC y ME SUNQUIST. 2001. Trophic relations in a community of African rainforest carnivores. *Oecologia* 127:395-408.
- ROSCOE HG y MJ FAHRENBACH. 1963. Removal of fecal pigments and its application to the determination of fecal bile acids in the rat. *Analytical Biochemistry* 6:520-529.